

## **Task 5.7: Sistemi dimostrativi per la produzione di biogas da prodotti e derivati contaminati da micotossine**

### **5.7.1 Breve stato dell'arte e riferimenti alla valenza di innovazione scientifica, economica e sociale dell'azione (max 1 pagina)**

*Linea 1: Valutazione della sedimentazione e della flottazione di digestati di impianti di digestione anaerobica alimentati con differenti tipologie di biomasse*

Gli impianti di digestione anaerobica sono caratterizzati da tabelle di alimentazione estremamente diversificate che conferiscono particolari proprietà chimico-fisiche al materiale in fermentazione. Il sistema di miscelazione dei fermentatori è indispensabile per il mantenimento di una temperatura omogenea del digestato, per il contatto del materiale organico con i consorzi microbici e per la fuoriuscita del biogas prodotto in fase liquida.

I substrati utilizzati possono essere caratterizzati da un contenuto più o meno elevato della componente a fibra lunga che tende a formare aggregati a bassa densità aventi la tendenza a posizionarsi nella parte superiore del digestore (strati flottanti e croste); vengono anche utilizzate biomasse con solidi facilmente sedimentabili, sia di tipo organico che inorganico, il cui utilizzo può determinare la formazione di depositi sul fondo del digestore con spessori che raggiungono anche alcuni metri nei casi più critici.

Impianti alimentati a FORSU (Frazione Organica del Rifiuto Solido Urbano) vanno incontro ai medesimi problemi degli impianti di tipo agro-zootecnico: in questo caso gli strati flottanti possono derivare da accumuli di plastiche residue mentre i depositi sul fondo sono spesso causati da metalli o vetro non rimossi in precedenza.

In aggiunta a ciò, l'attività batterica determina la formazione di esopolisaccaridi, composti ad elevato peso molecolare secreti dai microrganismi durante il loro metabolismo o la lisi cellulare, che conferiscono proprietà colloidali più o meno marcate al digestato.

Negli impianti di digestione anaerobica si può incorrere frequentemente in una situazione di insufficiente miscelazione dei digestori che può essere riconducibile a cause differenti tra cui una sbagliata progettazione, un guasto elettromeccanico, un'errata impostazione dei tempi di funzionamento o essere correlata ad una scorretta gestione dei substrati in ingresso. In queste situazioni, ad esempio, si può incorrere in una marcata stratificazione del fluido con formazione di strati flottanti e depositi sul fondo anche nello spazio di qualche ora. L'insufficienza nella miscelazione determina, nei casi meno gravi, un abbassamento di efficienza del processo produttivo del biogas mentre, nei casi più rilevanti, ad un inevitabile e consistente perdita di produzione di biogas a cui si va aggiungere lo sforzo economico necessario per individuare il problema e risolverlo ricorrendo ai servizi di aziende specializzate nella bonifica dei serbatoi di fermentazione. Per un gestore di impianto risulta quindi importante conoscere le tempistiche di sviluppo di tali stratificazioni, comprenderne l'entità e le dinamiche di sviluppo per poter operare successivamente le corrette manovre volte ad un ripristino dell'intero sistema.

A ciò si aggiunga la necessità di ottimizzare il trattamento del digestato ai fini del suo corretto impiego in fertirrigazione (allontanamento e recupero nutrienti) o, seppure raro, del suo invio a depurazione biologica.

Le ricadute applicative di tale attività saranno di interesse, come già specificato in precedenza, soprattutto per i proprietari e gli operatori di impianti di biogas; i dati raccolti potranno essere anche la base per l'arricchimento della conoscenza riguardante la fluidodinamica del digestato, attualmente basata su valori di riferimento non supportati da verifica sperimentale.

*Linea 2: Uso energetico di farine contaminate da micotossine*

*Linea 4: Impiego di frumento e prodotti derivati contaminati da micotossine da utilizzare come substrato per la produzione di biogas.*

Gli esperti del settore stimano che i cambiamenti climatici porteranno a variazioni anche rilevanti nella presenza di funghi tossigeni nei cereali; le misure preventive messe in atto negli ultimi anni, anche se costantemente aggiornate (linee guida, modelli previsionali, biocontrollo) potrebbero non essere sufficienti per ottenere regolarmente un prodotto a norma di legge. In Emilia-Romagna, ma non solo, la campagna 2012, a causa delle condizioni climatiche estreme, è stata di esempio in questo senso; quote rilevanti di mais sono risultate non conformi per il contenuto dell'aflatossina AFB1, con grosse difficoltà degli operatori del settore. L'individuazione di una strada alternativa di impiego per le partite di farine dei diversi cereali "non conformi" per l'uso zootecnico e/o alimentare è da ritenersi prioritaria a livello nazionale per dare risposte concrete ai produttori agricoli da un lato e dall'altro evitare comportamenti non corretti con ritorno nel circuito mangimistico e alimentare di tali flussi, tutelando concretamente la salute umana.

Parallelamente, nello stesso comparto agricolo lo sviluppo della produzione di energia rinnovabile da digestione anaerobica ha portato alla presenza sul territorio nazionale di circa 1.400 impianti alimentati con effluenti zootecnici, colture dedicate e sottoprodotti agro-industriali, cui le partite di farine non conformi possono essere destinate.

Tuttavia, questa possibile destinazione d'uso ha aperto una serie di interrogativi che solo in minima parte ha potuto trovare qualche risposta in risultati di attività di ricerca già disponibili. L'efficienza del processo di digestione può risentire della presenza di questi contaminanti? Il processo di digestione anaerobica è in grado di ridurre l'entità della contaminazione da micotossine del materiale in digestione? L'uso agronomico dei digestati può contribuire ad arricchire il terreno agrario di queste sostanze tossiche?

Sul tema "micotossine e digestione anaerobica" la bibliografia internazionale e nazionale è davvero ridotta; in proposito i risultati più mirati e funzionali per dare risposte alle domande di cui sopra, sono quelli emersi dal progetto "Biogas\_micotossine\_clostridi" finanziato dalla regione Emilia-Romagna e condotto da CRPA, dal quale sono emersi risultati confortanti, nello specifico in merito al comportamento delle aflatossine (AFB1 nello specifico). E' stato infatti verificato che il comportamento in digestione anaerobica di farine contaminate con AFB1 (sino a 10-20 volte il limite ammesso per uso zootecnico) impiegate in dosi pari al 10% in peso della dieta giornaliera è del tutto analogo a quello delle farine esenti; in altre parole non si sono osservati effetti di inibizione del processo biologico. Nonostante la graduale alimentazione con farine contaminate, non sono stati misurati effetti di accumulo; al contrario la concentrazione di AFB1 misurata nei digestati sono chiaramente inferiori a quelle attese e, nelle condizioni di prova precisate, si aggirano su valori inferiori a 10 µg/kg ST anche nella tesi a maggiore contaminazione. La degradazione biologica di AFB1 risulta evidente dal bilancio di massa complessivo, con riduzione in peso variabile dal 62 al 98% della quantità totale caricata.

Considerata la numerosità delle micotossine prodotte dai diversi funghi tossigeni che si possono insediare sui cereali e la loro pericolosità per la salute umana il quadro delle conoscenze deve necessariamente essere ampliato e completato per confermare i risultati ottenuti per le aflatossine e integrarli con risultati ottenuti in relazione ad altre micotossine, quali fumonisine e Deossivalenolo (DON). Le micotossine sono contaminanti naturali per cui la loro comparsa non è controllabile in toto; la definizione di strade alternative di valorizzazione per le farine non conformi è quindi della massima importanza. Una volta definito un percorso virtuoso per gestire anche tali flussi, esso potrà essere intrapreso ogni volta che se ne presenteranno le condizioni, evitando ripercussioni negative non solo di tipo economico, ma soprattutto sulla qualità delle derrate alimentari.

*Linea 3: Clostridi e digestione anaerobica*

A seguito dell'ampia diffusione degli impianti di biogas di tipo agrozootecnico verificatasi a partire dal 2009 in poi il tema della validità agronomica e ambientale del digestato, il sottoprodotto di risulta della digestione anaerobica destinato all'uso agronomico, è stato spesso affrontato in modo non corretto e incompleto, causando spesso allarmismi generalizzati tra la popolazione. In particolare, uno dei timori più diffusi è la possibilità che in digestione anaerobica, trattandosi di un processo biologico, si abbia non solo lo sviluppo dei batteri utili alla produzione di biogas, ma anche quello di batteri patogeni per la salute umana. Nello specifico, tra le specie presenti nel consorzio batterico che opera in digestione anaerobica rivestono un ruolo fondamentale quelle appartenenti al genere *Clostridium*. In materia di Clostridi e digestione anaerobica diversi sono gli aspetti salienti; la valutazione della possibilità che il processo di digestione anaerobica da biomasse agro-zootecniche e il conseguente uso agronomico dei digestati contribuiscano alla diffusione e all'accumulo ambientale di spore di batteri del genere *Clostridium* è di fondamentale importanza in relazione al ruolo che le spore hanno come causa di difettosità anche gravi della produzione di formaggi a lunga stagionatura e prodotti senza l'ausilio di antifermentativi. L'altro aspetto saliente è invece la possibilità di arricchire l'ambiente di altre specie del genere *Clostridium* che presentano caratteristiche di patogenità come il *Cl. butulinum* e il *Cl. perfringens*. In tema di rischio della contaminazione ambientale da spore di *Clostridium* a seguito dell'uso agronomico del digestato una prima serie di sperimentazioni hanno portato a risultati tendenzialmente tranquillizzanti, caratterizzati da una certa variabilità, peraltro attesa data la ubiquità delle spore di clostridi e la difficoltà della loro corretta quantificazione. In materia di correlazione tra Clostridi patogeni e digestione anaerobica, la bibliografia scientifica solo di recente si sta arricchendo dei primi risultati di attività di ricerca mirati. Anche su questo tema, le prime evidenze scientifiche portano ad affermare che non sussistono preoccupazioni reali in termini di incremento del rischio igienico-sanitario dovuto al genere *Clostridium*. Lo stesso progetto "BiogasDOP" finanziato dal MIPAAF, ha portato a risultati, di recente presentati e in corso di pubblicazione, che vanno nella stessa direzione. Tuttavia il tema è talmente importante per la salute umana e per la accettabilità sociale degli impianti di biogas agro-zootecnici che è prioritario proseguire con l'ampliamento delle conoscenze.

#### **5.7.2 Profilo ed esperienza dei proponenti e partecipanti in relazione all'attività (riportare anche max 5 pubblicazioni in totale) (max 1 pagina)**

##### **Task leader:**

**Claudio Fabbri** - UO CRPA, *Linea 1* (vedi Task 5.4).

##### Partecipanti:

**Lorella Rossi** - UO CRPA, *Linea 2, 3 e 4*. Dottore Agronomo iscritto all'Ordine della Provincia di Piacenza dal 1989, sino al 1991 si è occupata di problematiche connesse con la gestione di effluenti zootecnici e residui agricoli e delle relative tecniche di valorizzazione (utilizzo agronomico, compostaggio). Dal 1992 è ricercatrice presso il settore Ambiente del Centro Ricerche Produzioni Animali di Reggio Emilia. In qualità di Responsabile di Progetto ha gestito numerosi progetti di ricerca, finanziati da MIPAAF, ISPRA (ex APAT), regione Emilia-Romagna inerenti le seguenti tematiche: messa a punto e gestione di controllo di impianti pilota e dimostrativi di compostaggio e digestione anaerobica per effluenti zootecnici e agroindustriali, fanghi di depurazione civile e frazioni organiche da raccolta differenziata; coordinamento e gestione di indagini territoriali dirette e indirette mirate alla qualificazione e alla quantificazione di sottoprodotti e rifiuti organici selezionati a livello regionale e nazionale; di progetti di sperimentazione sull'impiego di fertilizzanti organici in agricoltura; coordinamento e gestione di progetti di sperimentazione e di monitoraggio in scala reale inerenti lo studio degli aspetti igienico-sanitari legati alla digestione anaerobica e all'uso del digestato e lo studio del comportamento di farine contaminate da micotossine in digestione anaerobica.

Ha svolto inoltre attività di assistenza tecnico-scientifica in merito a progettazione di massima di impianti di compostaggio e digestione anaerobica per biomasse agro-zootecniche e rifiuti organici di varia natura; assistenza nelle procedure autorizzative per avvio attività di recupero rifiuti (D.Lgs 5 febbraio 1997, n.22; D.M 5 febbraio 98); assistenza in fase di stesura e applicazione di sistemi di controllo qualità o piani di sorveglianza e controllo; assistenza alla realizzazione e gestione di impianti di digestione anaerobica, con particolare attenzione alla gestione dei sottoprodotti e alla stesura dei PUA per digestati; assistenza alla procedura di gestione di residui agro-industriali come “sottoprodotti” ai sensi dell’art. 184 bis del D.Lgs. 152/06. È autrice e co-autrice di numerosi articoli divulgativi e scientifici su riviste di settore e ha partecipato in qualità di relatore a diversi corsi, convegni e seminari nazionali ed internazionali.

**Gabriella Aureli** - UO CREA-QCE, *Linea 2 e 4*. Laurea in Scienze Biologiche nel 1983 presso l’Università degli Studi di Roma “La Sapienza”, Abilitazione alla professione di Biologo, Dottorato di ricerca in Biologia Cellulare e Molecolare (II Università di Roma “Tor Vergata”; Diploma di Specializzazione in Patologia Generale (Università di Roma “La Sapienza”). Ricercatore dal 1990 presso i Monopoli di Stato e dall’1 giugno 2001 presso il CREA-QCE. Idoneità al concorso per primo ricercatore (2009). Principali argomenti di ricerca svolti: studio della fermentazione del tabacco da sigaro inerente alle specie batteriche coinvolte nel processo fermentativo del tabacco e messa a punto di un sistema di monitoraggio della concentrazione di alcuni gas (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>) durante il ciclo di fermentazione industriale; qualità igienico-sanitaria dei cereali, soprattutto frumento, farro, mais e sorgo, concernente la rilevazione di micotossine tramite l’applicazione di tecniche immunoenzimatiche e cromatografiche; studio della stabilità di fusariotossine in soluzione; abbattimento della contaminazione da tricoteceni attraverso processi di prima trasformazione (decorticazione) e seconda trasformazione (pasta); rilevazione cromatografica di indicatori (ergosterolo) di contaminazione fungina dei cereali; prevenzione della contaminazione fungina e/o della produzione di micotossine nelle derrate cerealicole attraverso la messa a punto di un sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati di temperatura all’interno di silos di stoccaggio; qualità tecnologica del frumento (in particolare frumento duro e farro) riguardo alla caratterizzazione elettroforetica delle proteine di riserva e ai parametri biochimici e reologici. Partecipazione a progetti nazionali, regionali e convenzioni, anche in qualità di responsabile scientifico. Collaborazione con istituzioni di ricerca nazionali (Università, CNR, ISS). Relatore esterno e co-tutor per tesi di laurea, dottorato, master e borse di studio. Socia AISTEC. Autore e co-autore di pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali e internazionali.

**Salvatore Moscaritolo** - UO CREA-QCE, *Linea 2 e 4*. Laurea in Scienze delle Preparazioni Alimentari, Dottorato di Ricerca in Biotecnologie dei Prodotti Alimentari, abilitazione all’esercizio della professione di Tecnologo Alimentare. Ricercatore CREA dal 2003 ad oggi presso le seguenti strutture: CREA-CER, CREA-SCV e CREA-QCE. Ulteriore attività è stata svolta (dal 1994 al 2015) presso molteplici PMI chimico-alimentari operanti nella filiere cerealicole e olearie la cui attività ha riguardato: coordinazione nella riorganizzazione delle attività aziendali, funzione di Responsabile qualità, e funzione di Responsabile ricerca e sviluppo di processo e prodotto. Autore e co-autore di 1 libro e di numerose pubblicazioni scientifiche su riviste italiane e straniere; relazioni orali e poster in congressi, seminari, ecc., su aspetti relativi alla qualità tecnologica e nutrizionale dei prodotti agroalimentari e alla relative tecnologie di trasformazione. Partecipazione a numerosi progetti nazionali e regionali. Attività didattica in lezioni, corsi e seminari presso Università, Enti regionali e Strutture preposte allo sviluppo agricolo. Stesura/applicazione/verifiche e aggiornamento di tutte le procedure aziendali finalizzate alla certificazione, alla sicurezza e valorizzazione qualitativa di prodotti e/o processi agroalimentari quali: manuali della qualità, HACCP, Tracciabilità, Norme UNI-EN-ISO 9000:94, BRC, ICF, sicurezza luoghi ambienti di lavoro; nel contempo è stata svolta attività di audit aziendale e di formazione degli operatori tecnici aziendali.

Le principali attività di ricerca hanno riguardato: valorizzazione delle produzioni agricole primarie e dei relativi prodotti di trasformazione; sviluppo e messa a punto di nuovi metodi analitici per valutare i parametri di qualità sia tecnologica che nutrizionale di cereali e prodotti derivati; caratterizzazione reologica e chimico/nutrizionale di materie prime, semilavorati e prodotti finiti a base di cereali; sviluppo di prototipi su processo di detossificazione del glutine da farine e semole di frumento; processi della tecnologia alimentare; miglioramento tecnologico di processo e prodotto; influenza della tecnica di molitura tradizionale e innovativa; valutazione dei processi di maturazione e lievitazione; sviluppo di miscele e preparati alimentari.

**Angela Iori** - UO CREA-QCE, *Linea 2 e 4*. Laureata con lode in Scienze Biologiche (1984), abilitata alla professione di biologo (1985) e iscritta all'Albo dell'Ordine Nazionale dei Biologi (1986). Vincitrice del concorso pubblico da Biologo del Maf (1988), poi inquadrata come Biologo Direttore e successivamente nel profilo di Tecnologo. Primo tecnologo presso il CREA-QCE dal 31/12/2001. Idoneità al concorso di Dirigente tecnologo (2009). Ha prestato servizio presso l'Istituto sperimentale per l'Orticoltura di Pontecagnano (SA) svolgendo il Servizio revisione analisi delle sementi e attività di ricerca (01/08/1988-28/08/1994). Dal 29/08/1994 ha prestato servizio presso l'Istituto sperimentale per la cerealicoltura, ora CREA-QCE, effettuando il Servizio di revisione analisi su farine e paste alimentari (fino al 2001), per la determinazione di vari parametri: umidità, acidità, contenuto in ceneri, presenza di sfarinati di grano tenero su semole e paste, contenuto in steroli ed estratto etereo su paste all'uovo. Nello stesso periodo ha svolto attività di ricerca finalizzata a studiare nuove metodiche di analisi per migliorare le analisi ufficiali e/o ottimizzare quelle già esistenti. A tal fine ha anche partecipato al ring-test che ha portato alla revisione del metodo nazionale per la determinazione dell'acidità in semola e pasta. Ha, inoltre collaborato a varie linee di ricerca nell'ambito di numerosi Programmi ordinari e Progetti straordinari. Co-autore di pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali ed internazionali e di capitoli di libri. È *tutor* e *co-tutor* di dottorati e tesi di laurea. Attualmente, presso il CREA-QCE, svolge attività di ricerca relativamente alle tematiche: studio sulla variabilità dei patogeni e della diffusione sul territorio, analisi del comportamento varietale del frumento e studi sulla genetica della resistenza a patogeni, studi sugli effetti della presenza di patogeni su caratteristiche qualitative della granella, realizzati anche mediante nuove tecniche (biochimiche, molecolari e analisi di immagine) per la diagnosi precoce delle malattie.

#### Pubblicazioni

- Aureli G., Amoriello T., Belocchi A., D'Egidio M.G., Fornara M., Melloni S., and Quaranta F. 2015. Preliminary survey on the co-occurrence of DON and T2+HT2 Toxins in Durum Wheat in Italy. *Cereal Research Communications*, 43(3), 481-491.
- Aureli G., Melloni S., D'Egidio M.G., Quaranta F., Haidukowski M., Pascale M., Lattanzio V.M.T, 2015. Effect of debranning on T-2 and HT-2 toxin content in durum wheat kernels and milling fractions. Proc. 10<sup>th</sup> AISTEC Conference "Grains for Feeding the World", Milan, 1-3 July, 128-132.
- Infantino A., Aureli G., Costa C., Taiti C., Antonucci F., Menesatti P., Pallottino F., De Felice S., D'Egidio M.G., Mancuso S. 2015. Potential application of PTR-TOFMS for the detection of deoxynivalenol (DON) in durum wheat. *Food Control*, 57, 96-104.
- Quaranta, F., Aureli, G., Camerini, M., Cecchini, C., Fornara, M., Gosparini, E., Melloni, S., Moscaritolo, S., D'Egidio M.G. 2014. Valutazione delle caratteristiche produttive, qualitative e igienico sanitarie del frumento duro in relazione alle tecniche di fertilizzazione in biologico. Secondo Congresso Nazionale della Rete Italiana per la Ricerca in Agricoltura Biologica – RIRAB.
- Rossi L., 2011. Tipologie di substrati per la produzione di biogas: effluenti zootecnici, biomasse agricole e agro-industriali Atti del Corso di aggiornamento: Biogas da agrozootecnica e agroindustria. Politecnico di Milano Febbraio 2011.

- Rossi L., 2013. Biogas da sanse e pastazzo d'agrumi: risultati di un test in continuo in impianto sperimentale. Atti Ecomondo 2013.
- Rossi L., 2014. Digestione anaerobica e aspetti igienico-sanitari: risultati preliminari di test in impianto sperimentale in continuo. Atti Ecomondo 2014.
- Rossi L., Soldano M., Piccinini S., Pietri A., 2015. Uso di farine contaminate a fini energetici (biogas): risultati di test in continuo in impianto pilota. Atti V Congresso nazionale "Le micotossine nella filiera agroalimentare". Istituto Superiore di Sanità 28-30 settembre 2015.

### **5.7.3 Obiettivi della task**

*Linea 1:* Quantificare e caratterizzare gli strati flottanti e sedimentabili (entità, caratteristiche chimico-fisiche, velocità di formazione) in digestati prelevati in diversi impianti di digestione anaerobica alimentati con diverse tipologie di biomasse al fine della messa a punto di sistemi ottimizzati di miscelazione e impianti ottimizzati per il trattamento del digestato ai fini del suo uso fertirriguo.

*Linea 2:* Valutare il comportamento e l'eventuale abbattimento delle micotossine introdotte con prodotti e sottoprodotti cerealicoli contaminati in digestione anaerobica, con riferimento alle micotossine più diffuse come, ad esempio, aflatossine (AFB1 e AFB2), fumonisine (FB1+FB2), deossivalenolo (DON); Valutare l'effetto della successiva fase di stoccaggio del digestato contaminato da micotossine sulla eventuale ulteriore azione di riduzione indotta dall'attività microbiologica residua presente;

*Linea 3:* Verificare gli effetti del processo biologico di digestione anaerobica a partire da biomasse agro-zootecniche diverse condotto in condizioni termometriche diverse (mesofilia e termofilia) sulla evoluzione delle specie batteriche del genere *Clostridium*. Verificare il rischio di sviluppo in digestione anaerobica di forme patogene di Clostridi in relazione a piani di alimentazione diversi e a regimi termometrici diversi.

*Linea 4:* Proporre una soluzione sostenibile ed efficace per lo sfruttamento a fini energetici, mediante produzione di biogas, di materie prime a base di frumento e suoi derivati, non utilizzabili ai fini dell'alimentazione umana o animale in quanto non conformi alla normativa vigente, per limiti fissati o raccomandati, riguardo al contenuto in micotossine. L'ottimizzazione di questo processo potrà offrire una soluzione conveniente e sostenibile per l'utilizzazione del digestato a ridotto contenuto di micotossine come ammendante agricolo oppure, in alternativa, l'impiego dello stesso, considerevolmente ridotto in quantità, da destinare alla gassificazione/ combustione con ulteriore ricavo energetico in termini di produzione di gas o calore.

### **5.7.4 Descrizione delle attività che saranno sviluppate nella task**

*Linea 1:*

Saranno effettuate, in scala di laboratorio, misurazioni ripetute per quantificare le velocità di formazione di strati flottanti e di sedimenti in digestati provenienti da impianti di digestione anaerobica in scala reale alimentati con diverse tipologie di biomasse in rapporti ponderali variabili. Proprio per l'intrinseca variabilità dei digestati e le mutevoli condizioni presenti su scala reale, verranno effettuate misure con metodologie da mettere a punto anche sulla base del campione in oggetto; esse potranno essere basate sia su metodologie classiche utilizzate per la quantificazione di sedimenti e di strati flottanti che su metodiche non convenzionali applicabili a questa tipologia di fluido.

### Linea 2:

Lo studio del comportamento delle micotossine durante il processo di digestione anaerobica e il loro eventuale accumulo nel digestato sarà condotto mediante lo svolgimento di test sia in batch (test BMP a norma UNI EN ISO 11734:2004) che di tipo dinamico. Entrambi le tipologie di test saranno condotti con l'ausilio della strumentazione specifica ideata e realizzata e in dotazione a CRPALab. Prima dell'avvio dei test in continuo, si procederà ad una ottimizzazione del sistema sperimentale da impiegare per la loro conduzione; nello specifico, gli aspetti da ottimizzare sono la rilevazione della qualità del biogas prodotto per incrementare ulteriormente la precisione delle misura del metano effettivamente prodotto e il sistema di acquisizione dati per garantire la massima velocità di output sull'andamento del processo biologico. Ciascun test in continuo, della durata di almeno 2-3 mesi consentirà di testare da 3 a 6 miscele diverse per ciascun ciclo.

Tale impianto sperimentale è costituito da 3 minidigestori in acciaio alimentati in continuo, di volume di 24 dm<sup>3</sup>, miscelati e riscaldati, con misura in continuo della quantità di biogas prodotto (sistema manometrico) e misura discontinua della qualità del gas prodotto. La metodologia prevede il carico e lo scarico giornaliero, (o anche con maggior frequenza). Il sistema può operare in mesofilia e in termofilia. Ciascun reattore ha una linea indipendente e non vi sono parti in comune fra loro. Grazie al monitoraggio quali-quantitativo di dettaglio eseguito per singola tesi, ciascuna replicata tre volte, sarà possibile effettuare il bilancio di massa complessivo dal quale emergerà il reale livello di abbattimento di ciascuna micotossina rilevata in ingresso.

Per quanto riguarda la determinazione del contenuto di micotossine nei digestati estratti dai test in continuo essa sarà effettuata sia mediante analisi HPLC-MS, sia mediante test immunoenzimatici (vedi Linea 4).

I digestati contaminati da micotossine generati dai test di cui sopra saranno accumulati e posti in stoccaggio in piccoli tank posti in ambiente controllato e lasciati indisturbati per almeno 60 giorni dall'ultimo scarico. Il campionamento in almeno due momenti successivi consentirà di verificare l'eventuale ulteriore abbattimento indotto dall'attività microbica residua ancora presente nel digestato.

La scelta di prodotti e sottoprodotti contaminati da micotossine sarà effettuata in collaborazione con il CREA-QCE (vedi Linea 4).

### Linea 3:

Lo studio della evoluzione delle specie del genere *Clostridium* già presenti o che si potrebbero sviluppare durante il processo di digestione anaerobica e la relativa presenza nel digestato sarà condotto mediante lo svolgimento di test in continuo nell'impianto sperimentale realizzato da CRPALab, già descritto per le attività della Linea 3.

Ciascun test in continuo avrà una durata complessiva di almeno 2 mesi e consentirà di testare da 3 a 6 miscele diverse per ciascun ciclo. Ciascun reattore ha una linea indipendente e non vi sono parti in comune fra loro. I test potranno essere condotti sia in mesofilia che in termofilia. Le biomasse caricate e il digestato in uscita saranno caratterizzate con tecniche di indagine innovative.

In ciascun campione si eseguirà l'analisi della popolazione microbica con il sistema di next generation sequencing; in sostanza, si procede alla estrazione del DNA e si esegue la sequenza del 16S rRNA microbico nel digestato, arrivando a ricostruire la comunità microbica nel periodo di processo considerato.

### Linea 4:

Verrà effettuato uno studio di prodotto e di processo per ottenere sia un significativo abbattimento del contenuto in micotossine nel digestato sia la massima resa in termini energetici (produzione di biogas), ossia il massimo potenziale metagenico dai substrati fermentabili sotto forma sia di granella intera che di frazioni di molitura, considerato che in queste ultime il contenuto in micotossine si ridistribuisce in modo diversificato. Infatti, anche con l'impiego di granella pulita, e con livelli di contaminazioni a norma, si possono ottenere frazioni della molitura (crusca e

cruschello) aventi concentrazioni notevolmente più elevate in contaminanti. Fra l'altro, queste frazioni di scarto sono attualmente utilizzate per la realizzazione di miscele e/o formulati ricchi in fibra destinati all'alimentazione umana e soggetti a normazione. Saranno reperiti lotti di granella di frumento non conformi alla normativa vigente per il contenuto di alcune fra le più diffuse micotossine del frumento soggette a normazione (es.: deossinivalenolo, T2/HT2, zearalenone, ocratossina, ecc.), sia per limiti fissati che raccomandati. I campioni di ciascun lotto saranno sottoposti preventivamente a operazioni di pulitura della granella con raccolta del materiale di scarto (pula con altri residui vegetali e semi estranei); la granella pre-pulita, decorticata e non, verrà sottoposta a macinazione con raccolta delle principali frazioni della molitura (farina/semola, crusca e germe, cruschello-tritello-farinaccio). Sullo sfarinato integrale del prodotto tal quale, o decorticato, e su tutte le frazioni sopra elencate verranno effettuate analisi di verifica del contenuto in micotossine con metodi immunoenzimatici e/o cromatografici. La valutazione della resa energetica verrà effettuata anche tenendo conto della granulometria dei prodotti ottenuti sia mediante un processo standard di molitura sia attraverso una rimacinazione di alcune frazioni più grossolane come, ad esempio, il macinato integrale, la semola e la crusca.

### **5.7.5 Descrizione degli output della task (deliverable)**

D.5.7.1: Quantificazione e caratterizzazione degli strati flottanti e sedimentabili (entità, caratteristiche chimico-fisiche, velocità di formazione) in digestati prelevati in diversi impianti di digestione anaerobica alimentati con diverse tipologie di biomasse al fine della messa a punto di sistemi ottimizzati di miscelazione e impianti ottimizzati per il trattamento del digestato ai fini del suo uso fertirriguo.

D.5.7.2: I risultati ottenuti dalle attività proposte consentiranno di allargare lo stato delle conoscenze già acquisite perché si estenderà la verifica della degradabilità biologica delle micotossine condotta con approccio scientifico anche ad altre micotossine, oltre a confermare l'abbattimento riscontrato per la più pericolosa (AFB1) in condizioni di processo diverse (rapporto e tipologia delle biomasse in ingresso).

D.5.7.3: Evoluzione delle specie batteriche del genere *Clostridium* in digestione anaerobica a partire da biomasse agro-zootecniche diverse condotto in condizioni termometriche diverse (mesofilia e termofilia). Valutazione del rischio di sviluppo in digestione anaerobica di forme patogene di Clostridi in relazione a piani di alimentazione diversi e a regimi termometrici diversi.

#### **D.5.7.4**

Linea 4 1) abbattimento dei livelli di micotossine nel digestato ottenuto da fermentazione anaerobica, ai fini sia della produzione di biogas sia di un possibile utilizzo dello stesso come ammendante nei sistemi agricoli; 2) considerevole riduzione della massa iniziale contaminata, che rappresenta comunque uno scarto da trattare, la quale, sotto forma di digestato derivante dal processo di fermentazione anaerobica, può essere avviato a gassificazione ai fini di un ulteriore ricavo energetico (metano, idrogeno, ecc.) oppure semplicemente avviato alla combustione per ricavo di energia termica; 3) sfruttamento ai fini energetici, sotto forma di bio-digestato, di una matrice contaminata da micotossine che, in via preferenziale, sarebbe altrimenti destinata alla distruzione per normale combustione, con conseguenti effetti negativi per immissione di gas-serra e polveri sottili nell'ambiente; 4) l'insieme del processo rappresenta un percorso di smaltimento di matrici cerealicole che oltre ad essere altamente sostenibile per l'ambiente può offrire notevoli vantaggi dal punto di vista sia energetico che economico.

### **5.7.6 Articolazione temporale delle attività e dei deliverable previsti nella task(Gantt)**

		Attività		Deliverable
Quadrimestri	1	Linea 1, 2, 3, 4		
	2	Linea 1, 2, 3, 4		
	3	Linea 1, 2, 3, 4		D.5.7.1 D.5.7.2 D.5.7.3 D.5.7.4
	4	Linea 1, 2, 3, 4		
	5	Linea 1, 2, 3, 4		
	6	Linea 1, 2, 3, 4		D.5.7.1 D.5.7.2 D.5.7.3 D.5.7.4
	7			
	8			
	9			
	10			
	11			
	12			
	13			
	14			
	15			

Tutte le attività si sviluppano in un arco temporale di 24 mesi.

#### **5.7.7 Risultati attesi, ricadute e benefici, ostacoli prevedibili ed azioni correttive**

*Linea 1:* Caratterizzazione quali-quantitativa di strati flottanti e sedimentabili di digestati prelevati in diversi impianti di digestione anaerobica alimentati con diverse tipologie di biomasse al fine della messa a punto di sistemi ottimizzati di miscelazione e impianti ottimizzati per il trattamento del digestato ai fini del suo uso fertirriguo.

*Linea 2:* Valutazione del comportamento e l'eventuale abbattimento delle micotossine introdotte con prodotti e/o sottoprodotti derivati da cereali contaminati in digestione anaerobica, con riferimento alle micotossine più diffuse, come, ad esempio, aflatossine (AFB1 e AFB2), fumonisine (FB1+FB2), deossivalenolo (DON);

Valutazione della successiva fase di stoccaggio del digestato contaminato da micotossine sulla eventuale ulteriore azione di riduzione indotta dall'attività microbiologica residua presente.

*Linea 3:* Valutazione degli effetti del processo biologico di digestione anaerobica a partire da biomasse agro-zootecniche diverse condotto in condizioni termometriche diverse (mesofilia e termofilia) sulla evoluzione delle specie batteriche del genere *Clostridium* e valutazione del rischio di sviluppo in digestione anaerobica di forme patogene di Clostridi in relazione a piani di alimentazione diversi e a regimi termometrici diversi.

*Linea 4:* Messa a punto di una soluzione sostenibile ed efficace per lo sfruttamento a fini energetici, mediante produzione di biogas, di materie prime a base di frumento e suoi derivati, non utilizzabili ai fini dell'alimentazione umana o animale in quanto non conformi alla normativa vigente, per limiti fissati o raccomandati, riguardo al contenuto in micotossine. I risultati finali della linea di ricerca riguarderanno l'ottimizzazione del processo fermentativo anaerobico su substrati a base di frumento costituiti da granella intera e/o da frazioni di molitura per l'abbattimento dei livelli di

contaminazione da micotossine e la verifica di un metodo immunoenzimatico per il riconoscimento e la quantificazione delle micotossine l'applicabilità del metodo immunoenzimatico per la quantificazione delle micotossine su digestati.

Per il settore "biogas" e per il settore cerealicolo le ricadute dei risultati ottenuti dalle varie linee di attività sono diversi e di notevole importanza.

Le conoscenze in merito alle reali prestazioni delle tecnologie di pretrattamento meccanico applicate alle biomasse fibrose consentiranno di sfruttare al meglio il potenziale energetico delle biomasse dedicate e di scarto.

Le conoscenze in merito alle frazioni allontanabili dai digestati per "flottazione" e "sedimentazione" consentiranno di migliorare tutto il sistema di miscelazione negli impianti di tipo completamente miscelato e di mettere a disposizione informazioni preziose ai fini della progettazione delle linee di trattamento con allontanamento e recupero dei nutrienti e produzione di una frazione chiarificata ottimale per l'uso fertirriguo.

I risultati attesi dalla ricerca avranno ricadute positive in merito al problema dello smaltimento di matrici cerealicole contaminate da micotossine in quanto forniranno una valida soluzione alternativa alla loro "distruzione", da riservare alle sole frazioni post pulizia davvero molto contaminate.

La valorizzazione energetica dei substrati contaminati da micotossine tramite digestione anaerobica costituirà una valida via di recupero applicabile a grossi quantitativi di scarti cerealicoli contaminati da micotossine, sostenibile dal punto di vista ambientale ed economico. L'individuazione di una strada alternativa di impiego per le partite di matrici cerealicole "non conformi" per l'uso zootecnico e/o alimentare rappresenta una risposta concreta e vantaggiosa per i produttori agricoli da un lato e dall'altro consente di evitare comportamenti non corretti con ritorno nel circuito mangimistico e alimentare di tali flussi, tutelando concretamente la salute umana.

Non si prevedono, al momento, ostacoli rilevanti ai fini del raggiungimento degli obiettivi prefissati nelle linee di ricerca. Qualora fosse necessario, saranno eventualmente adottate azioni correttive in corso d'opera in merito sia alla programmazione temporale delle attività sia alla scelta di opportune soluzioni tecnico-scientifiche (es.: reperimento materiale idoneo, metodi di analisi, ecc.).

#### ***5.7.8 Piano di sfruttamento e divulgazione dei risultati***

Le conoscenze acquisite attraverso i risultati di tutte le linee di ricerca saranno divulgate e rese fruibili soprattutto attraverso pubblicazioni a carattere scientifico o divulgativo, eventi e incontri con gli operatori dei settori cerealicolo e delle energie rinnovabili e, più in generale, con gli operatori interessati alla gestione sostenibile di matrici cerealicole contaminate da micotossine e non utilizzabili ai fini della trasformazione per usi mangimistici e/o alimentari.

### ***5.7.9 Tabelle delle richieste finanziarie per singola azione***

**Tabella 5.7.9.1:** Attrezzature tecnico-scientifiche di cui si richiede il finanziamento.

**Tabella 5.7.9.2:** Richiesta complessiva di finanziamento per la task.